

ГЛАВА 1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция по применению «Токсикологическая оценка наноматериалов в тестах *in vitro*» (далее – Инструкция) устанавливает методы оценки токсического действия наноматериалов (наночастиц) с использованием тест-объектов различных уровней организации живой материи, преимущественно клеточного и субклеточного, включая культуры первичных и перевиваемых клеток тканей позвоночных животных, а также организменного уровня (культуры одноклеточных прокариотических и эукариотических организмов, семена высших растений).

2. Инструкция позволяет исследовать и оценить токсические свойства наноматериалов, предоставляет возможность изучения фрагментов токсикологического процесса, происходящего на клеточном и молекулярном уровне, механизма токсического действия, значительно расширяет объем получаемой в ходе экспериментов *in vivo* информации о токсичности. Преимуществом является соответствие современным требованиям об уменьшении количества и объемов экспериментов на высокоорганизованных животных и сокращении сроков исследований.

3. Методы, представленные в настоящей Инструкции, предназначены для установления выраженности опасного воздействия наноматериалов (наночастиц); полученные результаты учитывают при оценке риска для здоровья человека, что необходимо для разработки мер безопасного обращения с ними на всех стадиях их жизненного цикла.

4. Настоящая Инструкция предназначена для специалистов учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, иных организаций, осуществляющих оценку безопасности и безвредности для человека наноматериалов (наночастиц).

5. Предложенные в Инструкции тест-объекты могут быть предоставлены заинтересованным организациям государственным учреждением «Республиканский научно-практический центр гигиены».

ГЛАВА 2 ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ

6. Оборудование и средства измерения

Нормативная документация (СТБ, ГОСТ, ТУ и др.)

Иономер лабораторный И-160 (рН-метр лабораторный), предел допускаемой

абсолютной погрешности измерений $\pm 0,1$ ед. рН	
Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200г	ГОСТ 24104
Весы лабораторные аналитические, погрешность 0,0001 г	
Гомогенизатор для измельчения	
Шейкер планшетный термостатируемый	
Шейкер-встряхиватель	
Дистиллятор	
Мембранные установки для получения деионизированной воды	ОСТ 11-029.003-80
Термостат электрический с диапазоном рабочих температур 28-55 °С и отклонением от заданной температуры не более 1 °С	
Сушильный электрический шкаф	ГОСТ 13474
Термометр лабораторный 0-55 °С, цена деления шкалы – 0,5 °С	ГОСТ 215
Холодильник бытовой, обеспечивающий поддержание температуры ($+4 \pm 2$ °С)	ГОСТ 16317
Морозильная камера бытовая, обеспечивающая замораживание (-18 ± 3 °С)	
Автоклав вертикальный	ГОСТ 9586
Облучатель бактерицидный настенный	
Микроскоп световой биологический с увеличением 900-1000	ГОСТ 8284
Микроскоп инвертированный	
Баня водяная с электрическим подогревом и терморегулятором	
Ультразвуковая баня лабораторная 103 Н, 35 кГц	
Ультразвуковой диспергатор	
СО ₂ инкубатор	
Спектрофотометр или фотоэлектроколориметр лабораторный	
Флуориметр лабораторный	
Плашечный термостатируемый	
универсальный сканер флюоресцентных сигналов	
Проточный цитофлуориметр	
Иммуноферментный анализатор	

Лупа с увеличением 5-10	ГОСТ 8309
Бактерицидные лампы	
Стандарт мутности на 5 ед.	
Гигрометр психрометрический	
Ламинарный шкаф для культуры клеток (класс I)	
Ламинарный шкаф (класс II)	
Центрифуга лабораторная	
Ультрацентрифуга лабораторная, обеспечивающая более 100 тыс. g	

7. Материалы.

Воронки лабораторные	ГОСТ 25336
Пипетки автоматические, дозаторы любого типа объемом 0,02-0,5 мл \pm 1,0 %	
Пипетки вместимостью 0,5, 1,0 мл	ГОСТ 29227
Автоматические пипетки переменного объема 2-200, 100-1000, 500-5000, 1000- 10000 мкл	
Наконечники пластиковые объемом 1-200 куб. мм, 200-1000 куб. мм,	
Колбы плоскодонные конические разной вместимости	ГОСТ 1770-74
Колбы мерные объемом 50, 100, 200, 500, 1000 куб. см	ГОСТ 1770-74
Цилиндры стеклянные мерные лабораторные вместимостью 25, 50, 100, 1000 куб. см	ГОСТ 1770-74
Лабораторный штатив	ТУ 64-1-2669-73
Стаканчики для взвешивания (бюксы) диаметром 30, 40 мм	ГОСТ 7148
Стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 10, 50 мл	ГОСТ 25336
Флаконы и банки стеклянные с навинчивающейся крышкой или с притертой пробкой для отбора и хранения проб вместимостью 10, 50, 100 мл	
Стеклянные предметные	ГОСТ 9284
Стеклянные покровные	ГОСТ 6672
Камера Горяева для счета форменных элементов крови, мод. 851	
Петля бактериологическая	

Шпатель микробиологический пластиковый	
Пинцеты медицинские	ГОСТ 21241-89
Чашки Петри пластиковые микробиологические, стерильные	ГОСТ 23932-90
Пластиковые планшеты 6-, 12-, 24- и 96-луночные для культур клеток стерильные	
Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 куб. см типа Эппендорф	
Пластиковые флаконы для культур клеток объемом 25 куб. см	
Стерильные пластиковые пипетки градуированные	
Пробирки для цитометрического анализа	
Перчатки резиновые	ГОСТ 3-88

8. Реактивы.

Вода дистиллированная, х.ч.	ГОСТ 6709-72
Кислота серная 1 Н, х.ч.	ГОСТ 4278-76
Кислота соляная 1 Н, х.ч.	ГОСТ 3118-77
Натрия гидроксид (едкий натр), х.ч.	ГОСТ 2263-79
Спирт этиловый технический, ч.д.а.	ГОСТ 17299-78
Агар микробиологический	ФС 42-188ВС-90
Глюкоза, х.ч.	ГОСТ 6038-79
Калия гидроксид	ГОСТ 9285-78
Мясо-пептонный агар	
Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей	ГОСТ 13805-76
Бычий сывороточный альбумин, свободный от жирных кислот	
Калий фосфорнокислый двухзамещенный 3-водный, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 2493-75
Калий фосфорнокислый однозамещенный, ч.д.а.	ГОСТ 4198-75
Магний сернокислый семиводный, ч.д.а.	ГОСТ 4523-77
Натрий хлористый, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 4233-77
Натрия фосфат однозамещенный, ч.д.а.	ГОСТ 245-75
Натрия фосфат двузамещенный, ч.д.а.	ГОСТ 4172-76
Калий сернокислый, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 4145-74
Кальций углекислый, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 4530-76
Дрожжевой экстракт	ГОСТ 171-81
Метиленовый синий	

Трипановый синий	
Ортофосфорная кислота 85%	ГОСТ 6552
Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) динатриевая соль	
Tris –HCl	
Диметилсульфоксид (ДМСО)	
Ацетон	ГОСТ 2768-84
НАДФН	
Набор реактивов для определения белка по Лоури	
Набор реактивов для определения цитохрома P450	
Набор реактивов для определения активности лактатдегидрогеназы	
Этоксикумарин	
Этоксирезорурфин	
Бензоксирезорурфин	
Иодистый пропиций	
РНК-аза	
Среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM)	
Среда DMEM/F12	
Среда RPMI-1640	
Среда 199	
Раствор Хенкса без фенолового красного	
Фиколл	
Натрия амидотризоат	
Фетальная сыворотка теленка	
L-глутамин	
Трипсин	
Раствор Версена	
Гентамицина сульфат	
Бензилпенициллин	
Стрептомицин	
Амфотерицин В	
Флуоресцеин диацетат	
Гепарин натрия	
Лизирующий раствор	
Промывочный буфер	
Раствор желатина в ампулах	

3-(4,5-диметитиазол-2-ил)-2,5-
Дифенилтетразолий бромид (МТТ)
Нитросиний тетразолий (НСТ)
Конконавалин А (КонаА)

9. Тест-культуры

Первичная культура эмбриональных
фибробластов мыши, крысы

Рабочая коллекция
«Республиканский
научно-практический
центр гигиены»

Культура перевиваемых клеток А549
(культура клеток карциномы легкого
человека)

Рабочая коллекция
«Республиканский
научно-практический
центр гигиены»

Культура инфузорий *Tetrahymena pyriformis*
W.

Рабочая коллекция
«Республиканский
научно-практический
центр гигиены»

Salmonella thyphimurium (ТА 97, ТА 98, ТА
100, ТА 102)

Рабочая коллекция
«Республиканский
научно-практический
центр гигиены»

10. Допускается использование оборудования и материалов с аналогичными по назначению техническими и метрологическими характеристиками для проведения исследований в соответствии с настоящей Инструкцией. При их использовании следует руководствоваться рекомендациями изготовителя.

ГЛАВА 3

ПОДГОТОВКА ПРОБ НАНОМАТЕРИАЛОВ К ИССЛЕДОВАНИЮ

11. Для проведения исследований наноматериалы в виде порошков диспергируются в соответствующей среде. Преимущество следует отдавать физическим методам распределения в объеме (обработка ультразвуком, встряхивание, перемешивание).

12. В том случае, если для получения дисперсий наноматериалов необходим растворитель, носитель или поверхностно активное вещество, то необходимо проводить исследование их цитотоксичности.

13. Использование поверхностно активных веществ и органических растворителей для диспергирования наночастиц допускается только при условии предварительного исследования на

цитотоксичность, направленного на определение той концентрации, которая не вызовет искажения результатов.

14. При исследовании наноматериалов готовят растворы в концентрациях, определяемых на основе сведений о возможной токсичности и растворимости. При исследовании водорастворимых веществ в качестве растворителя используют дистиллированную воду, при исследовании водонерастворимых веществ – органические растворители (этиловый, изопропиловый спирт, ДМСО). Буферные растворы предварительно фильтруют через бактериальные фильтры либо стерилизуют автоклавированием.

15. В случае изучения смесей водорастворимых и водонерастворимых веществ и природных объектов допустимо как приготовление вытяжек, так и их непосредственное внесение в среду проведения исследования, в этом случае соотношение выбирается в зависимости от природы объекта и известных сведений о токсичности.

16. Способ диспергирования наночастиц серебра и углеродных нанотрубок.

16.1. Приготовить 4 % раствор БСА в дистиллированной воде.

16.2. В полученный раствор внести необходимое количество наноматериалов.

16.3. Смесь обработать ультразвуком в течение 1 ч на ультразвуковом диспергаторе (рабочая частота 44 кГц) на льду.

16.4. Приготовление рабочих концентраций из исходного раствора проводят с использованием 4 % раствора БСА.

ГЛАВА 4 ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ, РЕАКТИВОВ

17. Вся посуда, применяемая для культивирования клеток, микробиологических исследований должна быть стерильной.

18. Приготовление красителя метиленового синего для окрашивания. Готовят раствор из расчета 0,4 г метиленового синего на 100 мл воды. Раствор стоек и может храниться не менее 1 месяца.

19. Приготовление буфера состава 5 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl, 50 мМ Трис -HCl.

19.1. 1М Трис pH-7,5. Растворить 121,1 г Трис в 800 мл воды. Довести pH до 7,5 добавлением HCl и довести объем до 1 л. Раствор простерилизовать;

19.2. 0,5 М ЭДТА pH 8,0. К 186,1 г ЭДТА добавить 800 мл воды. Довести pH до 8,0 NaOH;

19.3. М NaCl. 29,22 г NaCl растворить в 80 мл воды и довести объем до 100 мл, простерилизовать;

19.4. для приготовления буфера: добавить 5 мл 1 М Трис pH-7,5, 0,1 мл 0,5 М ЭДТА pH-8,0 и 3,3 мл 5 М NaCl и довести до 100 мл дистиллированной водой.

20. Приготовление буфера состава 50 мМ Трис, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, pH 7,5.

20.1. 1 М Трис pH-7,4. Растворить 121,1 г Трис в 800 мл воды. Довести pH до 7,5 добавлением концентрированной HCl и довести объем до 1 л. Раствор простерилизовать;

20.2. 0,5 М ЭДТА pH-8,0. К 186,1 г ЭДТА добавить 800 мл воды. Довести pH до 8,0 NaOH;

20.3. 5 М NaCl. 29,22 г NaCl растворить в 80 мл воды и довести объем до 100 мл, простерилизовать;

20.4. для приготовления буфера: добавить 5 мл 1 М Трис pH-7,5, 0,2 мл 0,5 М ЭДТА pH-8,0 и 2 мл 5 М NaCl, довести до 100 мл дистиллированной водой и установить pH 7,4.

21. Приготовление 2 % раствора ортофосфорной кислоты. К 2,6 г 75 % ортофосфорной кислоты добавить 100 мл дистиллированной воды.

22. Приготовление физиологического раствора. 8,5 г хлористого натрия растворить в 1 дм куб. воды. Стерилизовать автоклавированием при + 121 °С в течение 30 мин.

ГЛАВА 5 УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ

23. Исследования проводят при температуре окружающего воздуха в лаборатории от + 18 °С до 25 °С. Относительная влажность воздуха 80 ± 5 %. Атмосферное давление 84-106 кПа (630-800 мм рт.ст.). Помещение не должно содержать токсичных паров и газов.

24. При использовании электроприборов частота переменного тока 50 ± 1 Гц. Напряжение сети 220 ± 10 В.

ГЛАВА 6 ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НАНОМАТЕРИАЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

25. Подготовка культур клеток к проведению исследований и внесение наноматериала в культуру.

25.1 Исследования наноматериалов проводят на первичных и перевиваемых клеточных культурах. Для правильной интерпретации

данных о токсичности наноматериалов следует использовать культуры нормальных и трансформированных клеток.

25.2 В случае использования первичных клеточных культур они должны быть получены из здоровых половозрелых животных, прошедших карантин в течение не менее 10 дней. Можно использовать как линейных, так и нелинейных животных. В случае использования линейных животных необходимо указать линию животных.

25.3 Для получения первичных клеточных культур используют стандартные методики, рекомендованные для конкретного вида клеток.

25.4 Получение культуры эмбриональных фибробластов мыши. Кожно-мышечную ткань 12-14-суточных эмбрионов дезагрегировать 0,25% раствором трипсина при 37 °С в течение 30 минут. После удаления трипсина с помощью шприца осадок суспендировать в ростовой среде (90% среды Игла, 10 % эмбриональной сыворотки телят с добавлением антибиотиков). Суспензию пропустить через капроновый фильтр (ячейка 0,3 x 0,3 мм). Концентрацию единичных фибробластов подсчитать в камере Горяева. Клетки высеять на чашки Петри при посевной плотности 100-300 тысяч на 1 см² ростовой поверхности и культивировать в ростовой среде в течение 5-7 дней.

25.5 Для унификации исследований первичные и перевиваемые клеточные культуры на протяжении всех экспериментов культивируют в стандартных условиях (при 37 °С, 5% CO₂, 95% относительной влажности). При подготовке перевиваемых клеточных культур к экспериментам используют стандартную методику пересева.

25.6 Перед экспериментом клетки стандартизировать по концентрации.

26. Количество вносимого наноматериала рассчитывают на куб. см питательной среды. Для выражения количества наноматериала используют единицы массы наноматериала (мг или мкг).

27. Общая продолжительность воздействия наноматериалов на клетки-мишени варьирует в зависимости от вида клеток-мишеней и типа экспериментов и может составлять от 1 часов до 14 дней (для непролиферирующих и слабопролиферирующих клеточных культур).

28. Подбор концентраций наноматериала, вносимого в культуру, осуществляется на основе предварительной информации производителя. Используемый диапазон концентраций (доз) наноматериала должен охватывать не менее трех порядков значений, начиная от недействующих концентраций и до концентраций, вызывающих стойкие изменения в клетках и (или) их гибель.

29. Если гибель клеток в эксперименте не происходит, то в протоколе указывается максимальная и минимальная концентрации (дозы) наноматериала.

30. Цитотоксичность наноматериалов оценивают по влиянию на жизнеспособность, изучая способность вызывать повреждения мембран, внутриклеточные метаболические изменения, окислительный стресс, а также на процессы апоптоза, выживаемость и пролиферативный потенциал эукариотических клеток в культуре.

ГЛАВА 7

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НАНОМАТЕРИАЛОВ С ПОМОЩЬЮ МЕТИЛТЕТРАЗОЛИЕВОГО ТЕСТА

31. Тест основан на способности митохондриальных дегидрогеназ конвертировать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразоли-ум бромид (МТТ) в фиолетовый формазан, накапливающийся в цитоплазме живых клеток. МТТ предназначен для выявления нарушений функции митохондрий, отражающих влияние на жизнеспособность клеток. Количество образуемого формазана в клеточном монослое пропорционально количеству живых клеток.

32. Выбор клеток-мишеней зависит от предполагаемых биологических эффектов наноматериала.

33. Для эксперимента клетки выращивают в CO₂-инкубаторе. Пересев производят в соответствии со стандартной процедурой в 96-луночный плоскодонный планшет для культур (посевная концентрация – 50-70 тыс. кл./мл).

34. Наноматериал подготавливают и на вторые сутки с помощью дозатора вносят в лунки со сформированным монослоем, как описано в главах 5 и 8.

35. После 24-часовой (при необходимости более длительной) экспозиции фотометрически измеряют суммарную активность митохондриальных дегидрогеназ клеток в каждой лунке в метилтетразолиевом тесте.

36. Для проведения МТТ соответствующий набор реактивов. Клетки инкубируют с раствором MTS в течение 20 минут в термостате, затем вносят лизирующий раствор для лизиса клеточного монослоя и растворения фиолетовых кристаллов формазана в цитоплазме клеток, после чего измеряют оптическую плотность раствора на планшетном спектрофотометре при $\lambda = 492$ нм.

37. В качестве контроля используется среда или растворитель, который добавляется в среду культивирования в той же концентрации, что и в составе исследуемого наноматериала.

38. Оценку результатов теста МТТ проводят путем сопоставления оптической плотности в опытных и контрольных лунках. Величина оптической плотности пропорциональна количеству живых клеток в лунках.

39. Результаты подвергают статистической обработке. Токсичность наночастиц оценивается по показателю IC_{50} (средняя ингибиторная концентрация – концентрация вещества, которая подавляет на 50% клеточную функцию).

40. Достоверность различий оптической плотности в опыте по сравнению с контролем определяют с помощью критерия Стьюдента. Различие признается достоверным при уровне значимости $P < 0,05$.

ГЛАВА 8

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НАНОМАТЕРИАЛОВ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТА НА АКТИВНОСТЬ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

41. Измерение активности лактатдегидрогеназы используется как один из основных тестов на цитотоксичность. Метод базируется на увеличении активности цитозольного фермента в среде культивирования, куда он высвобождается через поврежденные в результате лизиса или некроза мембраны. Небольшие количества бесклеточной среды берутся через определенные промежутки времени после воздействия наноматериалов на клетки для измерения высвобожденной лактатдегидрогеназы и определения зависимости токсического эффекта от временного фактора. В данном тесте по активности ЛДГ в среде культивирования можно судить о количестве погибших клеток в режиме реального времени.

42. Активность ЛДГ определяют колориметрическим методом с использованием соответствующего набора реактивов.

43. Принцип метода определения активности ЛДГ основан на способности ЛДГ восстанавливать лактат в пируват, превращая при этом $НАД^+$ в НАДН. Активность ЛДГ определяется в два этапа. На первом этапе ЛДГ катализирует превращение лактата в пируват и восстановление $НАД^+$ в НАДН. На втором этапе фермент диафораза, используя образовавшийся на первом этапе НАДН, катализирует восстановление желтой соли тетразолия в красный формазан. Таким образом, по интенсивности окраски можно судить об активности внеклеточной ЛДГ. Негативное воздействие наноматериалов оценивают

по способности нарушать целостность мембран клеток, измеряемой активностью ЛДГ во внеклеточной среде.

44. В качестве клеток-мишеней используют клетки первичных и перевиваемых культур (например, А549, эмбриональные фибробласты крысы). Подготовку клеток к эксперименту, разведение и внесение образцов наноматериалов проводят, как в главах 5 и 8.

45. Наноматериалы вносят в культуру в 3-х или более концентрациях. Экспозиция составляет 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120 ч, в зависимости от пролиферативной активности линии клеток.

46. Приготовить НАДН калибровку для колориметрического определения.

47. Внести 2-50 мкл пробы в лунки 96-луночного планшета в двух повторностях. Довести пробы до объема 50 мкл буфером для анализа ЛДГ.

48. Приготовить основную реакционную смесь, взяв 2 мкл смеси субстрата ЛДГ и 48 мкл буфера для анализа ЛДГ.

49. Добавить 50 мкл основной реакционной смеси в каждую лунку. Хорошо перемешать с помощью горизонтального шейкера или пипетированием. Планшет должен быть защищен от света в ходе инкубации.

50. Через 2-3 минуты провести начальное измерение ($T_{\text{исходное}}$). Измерить оптическую плотность при длине волны 450 нм в начальный момент времени $(A450)_{\text{исходное}}$. Важно, чтобы значение $(A450)_{\text{исходное}}$ находилось в линейной области кривой.

51. Инкубировать планшеты при 37 °С, проводя измерения $(A450)$ каждые 5 минут, пока значение в пробе не превысит 12,5 нмоль/лунка.

52. Конечное измерение [$(A450)_{\text{конечное}}$] для расчета активности фермента должно быть предпоследним измерением в конце линейного диапазона кривой. Время предпоследнего измерения – $T_{\text{конечное}}$.

53. Сделать поправку на фон. Построить калибровочную кривую для НАДН.

54. Рассчитать изменение результатов измерения оптической плотности от $T_{\text{исходное}}$ до $T_{\text{конечное}}$ для проб: $\Delta A450 = (A450)_{\text{конечное}} - (A450)_{\text{исходное}}$.

55. Сравнить $\Delta A450$ каждой пробы с калибровочной кривой для определения количества НАДН, образованного в ходе анализа, между $T_{\text{исходное}}$ и $T_{\text{конечное}}$ (В).

56. Активность ЛДГ пробы определяется следующим уравнением:

$$\text{Активность ЛДГ} = \frac{В \times \text{Фактор разбавления пробы}}{(\text{Время реакции}) \times V}, \text{ где} \quad (1)$$

V – количество (нмоль) НАДН, образовавшегося между $T_{\text{исходное}}$ и $T_{\text{конечное}}$;

Время реакции – $T_{\text{конечное}} - T_{\text{исходное}}$ (в минутах);

V – объем пробы (мл), добавляемой в лунку.

57. Активность ЛДГ представляется в нмоль/мин/мл (МЕ/мл). Единица активности ЛДГ – количество фермента, который катализирует превращение лактата в пируват с образованием 1,0 ммоль НАДН в минуту при 37 °С.

58. Оценку результатов теста проводят путем сопоставления оптической плотности в опытных и контрольных лунках. Величина оптической плотности пропорциональна количеству погибших клеток. Достоверность разницы оптической плотности опытного образца по сравнению с контролем определяют по критерию Стьюдента. Негативное воздействие наноматериала на жизнеспособность клеток считается выявленным при установлении различия на уровне значимости $P < 0,05$.

ГЛАВА 9

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НАНОМАТЕРИАЛОВ МЕТОДОМ ПОДСЧЕТА ПОГИБШИХ КЛЕТОК, ОКРАШЕННЫХ КРАСИТЕЛЕМ

59. Оценка целостности клеточной мембраны является одним из наиболее распространенных способов измерить жизнеспособность клетки и цитотоксические эффекты. Соединения, обладающие цитотоксичностью, часто вызывают нарушение целостности клеточной мембраны, что можно установить с помощью витального окрашивания трипановым синим /метиленовым синим, который свободно проникает через поврежденную мембрану и окрашивает внутриклеточные компоненты, но в здоровых клетках отсутствует.

60. Для оценки жизнеспособности более надежным способом является окрашивание клеточных суспензий, поскольку при окрашивании прикрепленных клеток они могут открепляться от субстрата и теряться. Главным недостатком этого метода является невозможность выявления клеток с нарушенной способностью к размножению.

61. Для проведения эксперимента культуру клеток (например, линии A549) рассеять в 24-луночные планшеты. Плотность посева – 15000 клеток/см².

62. Спустя 24 ч диспергированные наноматериалы с помощью дозатора внести в необходимом количестве в лунки с клетками.

63. Экспозиция выбирается с учетом пролиферативной

активности линии клеток. Для изучения токсического воздействия наноматериалов в динамике рекомендуем внесение наночастиц в лунки планшета с интервалом 1,5 ч на протяжении 7,5 ч.

64. После окончания экспозиции отмыть клетки от наночастиц физиологическим раствором.

65. К клеточной суспензии добавить 0,4% раствор трипанового синего / метиленового синего. Тщательно перемешать, выдержать 5 мин при комнатной температуре.

66. Заполнить камеру Горяева. Количество мертвых окрашенных клеток подсчитать с помощью светового микроскопа в пяти произвольных полях зрения.

67. Токсичность наноматериала оценивают по статистически значимому увеличению числа погибших клеток. Различие признается достоверным при уровне значимости $P < 0,05$.

ГЛАВА 10 ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОМАТЕРИАЛОВ ПО МОРФОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ КЛЕТОК НА ПРОТОЧНОМ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРЕ

68. Метод основан на учете показателей клеточного цикла в клетках животных, например, селезенки, тимуса, крови, а также в перевиваемых культурах клеток путем анализа гистограмм распределения содержания ДНК в клетках.

69. На основании гистограмм изучают распределение клеток по фазам клеточного цикла, используя специальные компьютерные программы.

70. Оценивают пролиферативную активность клеток, частоту микроядер для оценки мутагенного действия, частоту апоптоза для оценки программируемой гибели клеток.

71. В эксперименте используют клеточные суспензии, фиксированные этанолом, дважды отмытые фосфатным буфером с рН 7,0-7,2, которые фиксируют в охлажденном 70 % этаноле и при необходимости хранят при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до проведения следующего этапа.

72. Фиксированные клетки отмывают ФСБ, обрабатывают раствором РНК-азы (150 Ед/мл) и окрашивают раствором пропидиум иодида (50 мкг/мл) в течение 30 мин при комнатной температуре.

73. Далее пробы анализируют на проточном цитофлуориметре. Для возбуждения флуоресценции используют аргоновый лазер (1000 W) при $\lambda = 488\text{ нм}$. Измерения проводят при скорости до 2000 кл./с. В одной пробе анализируют не менее 30 000 клеточных ядер.

74. Процент апоптотических клеток рассчитывают на основании измерения гиподиплоидной ДНК, окрашенной иодистым пропидием (250 мкг/мл). На гистограмме в регионе M1 регистрируют апоптотические клетки с содержанием ДНК менее $2n2c$.

75. Клетки с микроядрами определяют по интенсивности флуоресценции (интенсивность светорассеяния пропорциональна размеру клеток). По рисунку выделяют пул клеток, содержащих микроядра. На основании полученных данных, исходя из предположения, что одна клетка – одно микроядро, рассчитывают % клеток с микроядрами по количеству ДНК менее 50 % в диплоидном ядре.

76. Токсичность наноматериала оценивают по статистически значимому увеличению числа клеток с учетом указанных маркеров. Различие признается достоверным при уровне значимости $P < 0,05$.

ГЛАВА 11

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОМАТЕРИАЛОВ ПО ИЗМЕНЕНИЮ ЭКСПРЕССИИ И ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМА P450 ПЕЧЕНИ МОДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

77. Выделение микросом проводят при 4°C или на льду.

77.1 Печени от 3-5 крыс помещают в буфер (0,1 М Трис-HCl; 0,1 М KCl; 1,0 mM ЭДТА; 1,0 mM дитиотрейтол; pH 7,4), измельчают скальпелем на кусочки размером до 5 мм, промывают в небольшом объеме этой среды и затем гомогенизируют в этом же растворе в гомогенизаторе в течение 4 циклов на максимальной скорости вращения по 15 с, а затем в гомогенизаторе готовят 25%-ный гомогенат.

77.2 Негомогенизированные частицы осаждают (10000 g, 20 мин). Микросомы получают из оставшегося супернатанта осаждением (105000 g, 80 мин), промывают их буфером (0,1 М K_2HPO_4 ; 1,0 mM ЭДТА; pH 7,4) и снова осаждают (100005 g, 60 мин).

77.3 Осадок (микросомы) ресуспендируют в буфере (0,01 М трис-ацетат; 20% глицерин; 1 mM ЭДТА; 1 mM дитиотрейтол; pH 7,4 замораживают в жидком азоте и далее хранят при -18°C. Перед использованием, после размораживания, суспензию микросом разводят (например, в 100 раз), а затем из разведенного пула используют в пробу 50 мкл суспензии микросом.

78. Измерение содержания P450 в микросомах проводят фотометрией восстановленного дитионитом карбонильного комплекса P450. Разностные спектры поглощения регистрируют на спектрофотометре. Для расчета концентрации P450 используют коэффициент молярной экстинкции $91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

79. Расчет концентрации цитохрома P450 в нмоль/мл производят по формуле:

$$C = \frac{\Delta D}{\varepsilon \cdot l}, \text{ где} \quad (2)$$

C – концентрация цитохрома P450 в нмоль/мл,

ΔD – разностный спектр показателей,

l – длина оптического пути,

ε – коэффициент молярной экстинкции.

80. Субстратспецифические активности (Б[а]П-гидроксилазная активность, этокси-, бензоксирезорурфидэтилазная активность) характеризуют по параметрам максимальной скорости реакции V_{\max} (нмоль продукта реакции/мин. реакции/нмоль цитохрома P450) и константе Михаэлиса K_M (мкМ субстрата). При этом количество продукта реакции определяют по калибровке (для Б[а]П-гидролазной активности строят калибровку по 3-ОН-Б(а)П; для резорурфиндеэтилазных активностей – по резорурфину в относительных единицах флуоресценции).

Константу Михаэлиса K_M в мкМ рассчитывают по формуле:

$$K_M = \frac{V_{\max}}{2} \quad (3)$$

Оба параметра рассчитывают по программе Enzfitter.

80.1 Анализ каталитической активности цитохрома P450 в реакции окисления Б[а]П в 3-ОН-Б(а)П осуществляют при 37°C в буфере (50 мМ трис-НСl, 3 мМ MgCl₂, рН 7,5) на шейкере в течение 30 мин.

80.2 Реакцию начинают внося НАДФН (50 мкМ в системе инкубации) в реакционную смесь с микросомами (0,3-0,5 мкМ цитохрома P450 и 0,5-10 мкМ Б[а]П в системе инкубации). Останавливают реакцию внесением 1 мл холодного (0-4°C) метанола, после чего добавляли 3,25 мл гексана и экстрагируют смесь встряхиванием 1 мин.

80.3 Из органической фазы отбирают 1 мл образца и экстрагируют 3-ОН-Б[а]П с помощью 3 мл 1N NaOH на шейкере (1 мин). Концентрацию продукта реакции (3-ОН-Б[а]П) в щелочной фазе определяют на флуориметре при $\lambda_{\text{ex}}=396$ нм и $\lambda_{\text{em}}=533$ нм в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см.

81. Анализ каталитической активности P450 в реакциях с этоксирезорурфином (при использовании в качестве индукторов полиароматических углеводов) и бензоксирезорурфином (при использовании в качестве индукторов лекарственных средств) проводят согласно стандартному подходу.

81.1 Субстраты вносят в тест-систему инкубации так, чтобы их концентрации в начале реакции примерно соответствовала величинам

K_M , равным концентрациям субстрата, при которых достигаются скорости реакций, равные $0,5 \times V_{max}$, диапазон 0,2-60 мкМ. Окисление, т.е. О-деалкилирование субстратов ведут 10 мин в 0,1 М трис-НСl буферном растворе (рН 7,2) при 30°C.

81.2 Реакцию начинают внесением НАДФН (100 мкМ в системе инкубации) в реакционную смесь с микросомами (0,3-0,5 мкМ цитохрома Р450 в системе инкубации). Останавливают реакцию добавлением 1 мл охлажденного до 4°C метанола (в реакциях с БР и ЭР). Концентрацию продуктов определяют на флуориметре при $\lambda_{ex}=365$ нм и $\lambda_{em}=455$ нм и ГР при $\lambda_{ex}=530$ нм и $\lambda_{em}=590$ нм.

81.3 Концентрацию белка в образцах микросом определяют методом Лоури. Метод основан на образовании биуретового комплекса, который в присутствии фенола дает характерную окраску пропорционально количеству белка.

81.4 Для построения калибровочной кривой на аналитических весах взвешивают 10 мг яичный альбумина, растворяют в 100 мл 0,1 N раствора NaOH, оставляют для полного растворения на ночь. При растворении альбумина щелочь приливают постепенно, не взбалтывая. В серию пробирок берется 0,1; 0,2; до 1 мл исходного раствора, объем в каждой пробирке доводится до 1 мл дистиллированной водой, соответственно приливается 0,9; 0,8 и т.д. мл воды. Контроль - 1 мл воды. После колориметрирования по полученным цифрам строится калибровочная кривая. На оси абсцисс откладываются значения концентрации (10γ, 20γ, 30γ и т.д.), по оси ординат - значения экстинции.

81.5 Для проведения анализа взвешивают на аналитических весах 200 мг исследуемой ткани. Растирают ее до образования однородной массы (гомогената) с 3 мл дистиллированной воды в фарфоровой ступке. Отмеривают микропипеткой 0,03 мл и выливают в пробирку с 7,5 мл 0,1 N раствора NaOH, взбалтывают. Из полученного раствора берут 1 мл, добавляют 4 мл реактива С, через 10 минут приливают 0,2 мл реактива Е. Инкубируют в темноте. Через 30 минут проводят измерения на ФЭК на красном светофильтре ($\lambda = 670$ нм) в кювете толщиной 20 мм. Контроль 1 мл дистиллированной воды, 4 мл реактива С, 0,2 мл реактива Е.

81.6 Расчет проводится по калибровочной кривой. При навеске 200 мг количество белка в γ умножается на $K = 2,52$, выражается в мг/г сырой ткани.

82. Удельное содержание цитохрома Р450 в нмоль/мг белка рассчитывают по формуле:

$$C_{уд.} = \frac{C_{P450}}{C_{белка}}, \text{ где} \quad (4)$$

C_{P450} – концентрация цитохрома Р450 в нмоль/мл,

$C_{\text{белка}}$ – концентрация общего белка в мг/мл.

83. Эффект токсического воздействия оценивают по статистически значимому увеличению экспрессии и ферментативной активности цитохрома P450 в печени модельных животных. Различие признается достоверным при уровне значимости $P < 0,05$.

ГЛАВА 12 ИЗУЧЕНИЕ ИНДУКЦИИ ОБРАЗОВАНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

84. В лунки 96-луночного планшета внести по 50 000 клеток линии A549 и инкубировать в среде культивирования на протяжении 24 ч.

85. Среду удалить, в каждую лунку добавить по 300 мкл раствора Хэнкса.

86. В лунки 96-луночного планшета внести по 20 мкл наноматериалов в изучаемых концентрациях, затем в каждую лунку добавить по 20 мкл раствора флуоресцеин диацетата (20 мкМ) и инкубировали 15 мин при 37 °С.

87. Измерить флуоресценцию клеток при $\lambda_{\text{возб.}}=485$ нм и $\lambda_{\text{эм.}}=518$ нм в течение 30 мин с помощью флуоресцентного фотометра планшетного формата.

88. Эксперимент выполняется в двух повторностях.

89. За 100% принимается флуоресценция в лунках, в которых вместо исследуемого наноматериала содержится 20 мкл физраствора.

ГЛАВА 13 ИЗУЧЕНИЕ ЭКОТОКСИЧНОСТИ НАНОМАТЕРИАЛОВ В ТЕСТАХ НА ИНФУЗОРИЯХ

90. Методы биотестирования по определению токсичности наноматериалов для гидробионтов применяются наряду с методами тестирования на культурах клеток и микроорганизмов при установлении требований к безопасности наноматериалов, поступающих во внешнюю среду в результате хозяйственной и иной деятельности.

91. Для биотестирования наноматериалов готовят их водную дисперсию. При этом следует применять механические и физико-химические методы диспергирования (перемешивание, встряхивание, ультразвуковая обработка), не влияющие на химический состав тестируемых наноматериалов. Использование при диспергировании поверхностно-активных веществ и органических растворителей не допускается. В исключительных случаях допускается применение носителей, биологическая

инертность которых подтверждена. Далее из исходной дисперсии готовят серию разведений с последовательно убывающими концентрациями наноматериалов, используя водопроводную дехлорированную воду.

92. Для определения средней летальной (эффективной) концентрации (LC_{50}) готовят серию (не менее пяти) разбавлений пробы тестируемого наноматериала. Величина LC_{50} определяется методом линейной интерполяции в системе координат, обеспечивающей максимальное приближение зависимости гибели тест-объектов от действующей концентрации к линейной (пропорциональной) зависимости.

93. Метод оценки безопасности наноматериалов по гибели инфузорий.

94. Метод основан на установлении различия между количеством погибших инфузорий в анализируемой пробе (опыт) и культивационной воде (контроль) и анализе характера роста популяции *Tetrahymena pyriformis*, развивающейся в среде культивирования, содержащей исследуемые объекты.

95. Биотестирование проводят в помещении, где не хранят летучие вещества и не работают с летучими веществами, не используют обработку помещения инсектицидами.

96. Температура анализируемой пробы при биотестировании должна быть $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$, концентрация кислорода в пробе в начале биотестирования – не менее 6 мг/л. Во время биотестирования пробы аэрируют. Длительность светового периода должна соответствовать естественному.

97. Повторность опыта трехкратная.

98. Подготовка к выполнению биотестирования.

99. В качестве тест-объекта используют лабораторную культуру *Tetrahymena pyriformis* W (далее Т.р.) – тест-объект исследований. Лабораторная культура одноклеточных животных (ресничные инфузории) произрастает в среде известного состава и является изолированной популяцией организмов, рост которой подчиняется общим закономерностям роста популяций. Количество наноматериала, вносимого в культуру, рассчитывается в мг/мл (мкг/мл) культуры.

100. Токсикологическая оценка в остром и подостром экспериментах осуществляется на популяции Т.р. в стационарной фазе роста. Основным критерием оценки острой токсичности является гибель 50% организмов и более в опыте по сравнению с контролем за время проведения биотестирования.

101. В остром и подостром экспериментах определяют LD_{16} , LD_{50} , LD_{84} , Ккум. Продолжительность экспериментов зависит от токсичности исследуемых наноматериалов. Так, длительность экспозиции в остром

эксперименте колеблется от 0,5 часа до 3-6 часов, а в подостром – от 2 часов до 24 часов. Общая длительность эксперимента – 2 рабочих дня.

102. Изучение токсичности в хроническом эксперименте осуществляется на протяжении жизненного цикла популяции Т.р. Концентрации наноматериалов подбираются с учетом результатов острого опыта. По результатам подсчета численности популяции в лаг-фазе, логарифмической фазе, фазе замедленного роста и стационарном состоянии рассчитывают показатели, характеризующие закономерности роста популяций: мгновенная скорость роста, время генерации, число поколений; рассчитывают ED_{16} , ED_{50} , ED_{84} , $K_{кум}$, $K_{рез}$, $K_{ад}$, Z_{chr} . Исходя из полученных данных, определяют МНД и рассчитывают показатель $LD_{50}/МНД$. Длительность хронического эксперимента составляет 96 часов.

103. Исследование осуществляется в стерильных условиях. Дисперсии наноматериалов и стерильная среда культивирования разливаются в стерильные колбочки с ватно-марлевыми пробками. Каждая концентрация исследуется не менее чем в трех повторностях. Колбочки с растворами дополнительно стерилизуются при 80-90⁰С в течение 15-20 минут. После охлаждения в пробы вносятся по 20 000 инфузорий в стационарной фазе роста. Пробы инкубируют при 25⁰С. Для регистрации состояния инфузорий и подсчета организмов из каждой колбочки стерильно отбирают по 1 мл культуры.

104. Через 24, 48, 72, 96 часов осуществляется регистрация состояния популяции и подсчет организмов.

105. Токсикологическая оценка в остром, подостром и хроническом экспериментах осуществляется согласно методическим рекомендациям «Ускоренный способ определения токсичности химических веществ и вытяжек из полимерных материалов» (утверждены МЗ БССР 01.09.1982), «Инструкции по гигиенической экспресс-оценке химических веществ, многокомпонентных смесей и полимерных материалов на *Tetrahymena pyriformis*» (утверждена МЗ РБ 11 июля 2002 года, регистрационный № 20-0102). В этих документах подробно описана техника постановки экспериментов и методика расчета токсикологических параметров.

ГЛАВА 14

ИЗУЧЕНИЕ ЭКОТОКСИЧНОСТИ НАНОМАТЕРИАЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СЕМЯН ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

106. Фитотест основан на способности проростков высших растений реагировать на изменение факторов внешней среды изменением

морфологических признаков, снижением всхожести.

107. Метод биотестирования позволяет проводить анализ предварительно диспергированных наноматериалов и нанесенных на поверхность семян.

108. В качестве индикаторов токсичности наноматериалов используют проростки семян однодольных и двудольных растений.

109. Семена тест-культур должны принадлежать к одному виду и сорту, быть одного года урожая, не обрабатываться протравителями и удостоверяться соответствующими документами.

110. В эксперимент отбираются неповрежденные (недеформированные) семена, всхожесть которых составляет не менее 95 %.

111. Предназначенные для проращивания семена предварительно прогревают при температуре 30 °С в течение 5 суток в термостате.

112. Проращивание семян осуществляют в чашках Петри диаметром 90 мм, куда вносят 10 мл диспергированного наноматериала. Нанесение исследуемого образца на поверхность семян проводят путем легкого встряхивания семян в бюксе с нужным количеством образца в течение 30 секунд. Для вещества с низкой прилипающей способностью добавляют 1 мл дистиллированной воды.

113. Предварительно чашки стерилизуют, охлаждают и маркируют. Каждый эксперимент проводится в 3-х повторностях.

114. В каждую чашку помещают по 30 семян. Сначала проводят посев контрольных семян, затем опытных с минимальными интервалами по времени. Перерывы в работе не допускаются.

115. Субстратом для проращивания семян служит стерильный физиологический раствор.

116. Чашки выдерживают в термостате при 20-23°С в течение 3 суток при определении процента всхожести и 7 суток при определении ингибирования роста проростков.

117. По истечении срока экспозиции чашки извлекают из термостата.

118. Проводят визуальную выбраковку. Выбраковываются образцы, отличающиеся от массива образцов в варианте. Если "нетипичных" чашек две и более на вариант - вариант бракуется полностью.

119. Подсчитывают процентную долю проросших семян.

120. Далее проводятся наблюдения и замеры, а данные замеров записывают в соответствующие таблицы.

121. Измеряют длину проростков (корней) в контрольных и опытных пробах, причем объектом измерения у каждого семени являлся проросток максимальной длины. Взвешивают отдельно корни растений.

122. Из ряда данных исключают пять наименьших значений, включая и непроросшие семена. Взошедшим считается побег длиной 5 мм и более, у которого первый настоящий лист занимает не менее половины колеоптиля. Нормальные побеги не должны иметь видимых морфологических изменений.

123. Рассчитывается средняя длина и масса корешков растений для каждой пробы.

124. Оценка достоверности межгрупповых различий проводится с использованием t-критерия Стьюдента. Различие признается достоверным при уровне значимости $P < 0,05$.

125. Если, по сравнению с контрольными, семена в исследуемых образцах не проросли или же длина корней в процентах от контрольного значения менее 80%, то образец наноматериала считается токсичным.

126. При длине корней в опыте свыше 120% от контроля предполагается, что исследуемый образец обладает стимулирующими свойствами.

ГЛАВА 15 ИЗУЧЕНИЕ МУТАГЕННОСТИ В ТЕСТЕ НА *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

127. Метод предназначен для выявления способности химических веществ или их метаболитов индуцировать генные мутации у индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium*. С помощью теста Эймса может быть выявлена способность наноматериалов индуцировать замены пар оснований в молекуле ДНК и мутации типа сдвига рамки считывания.

128. Каждый штамм должен быть проверен на ауксотрофность по гистидину, чувствительность к кристаллическому фиолетовому и устойчивость к ампициллину. Тестерные штаммы должны иметь уровень спонтанных ревертантов в пределах ожидаемого на основании литературных данных.

129. Максимальная доза тестируемого наноматериала определяется его токсичностью и растворимостью. Токсичность может изменяться при использовании экзогенной метаболической активации. Для нетоксичных хорошо растворимых соединений максимальная доза может быть в пределах 1000-5000 мкг/чашку. Для тестируемых соединений с бактерицидной активностью максимальная доза должна подавлять рост бактерий не более чем на 50%, что определяется либо по уменьшению количества спонтанных ревертантов, либо по подавлению роста бактериального газона. В любом случае должно проверяться не менее 5

различных концентраций (доз) наноматериала, различающихся, например, в 10 раз.

130. Наноматериалы с выраженной антибактериальной активностью изучать в тесте Эймса нецелесообразно.

131. Тест Эймса может быть поставлен в двух вариантах: без метаболической активации и в присутствии системы метаболической активации.

132. В каждом эксперименте обязательны одновременно проводимые негативный и позитивный контроли. Позитивные контроли должны быть специфичны для каждого тестерного штамма.

133. Бактерии *Salmonella typhimurium* обрабатываются наноматериалом в течение нескольких десятков минут.

134. После инкубации культуры тест-бактерий при 37 °С в течение двух суток подсчитывается количество ревертантных колоний в сравнении с количеством спонтанных ревертантов в негативном и позитивном контроле.

135. Если наноматериал и/или его метаболиты обладают мутагенной активностью, то они будут индуцировать обратные мутации от ауксотрофности к прототрофности по гистидину у гистидинзависимых штаммов *Salmonella typhimurium*.

136. Данные должны быть представлены в виде количества ревертантных колоний на чашку. Указывается количество колоний для каждой чашки, среднее количество ревертантных колоний на чашку и стандартное отклонение. Если ни в одном из вариантов на данном штамме (штаммах) не получено статистически значимых результатов, эксперимент прекращают.

137. Критериями позитивного результата являются или статистически достоверное зависимое от дозы увеличение количества ревертантов, или воспроизводимый и статистически достоверный позитивный ответ по крайней мере для одной экспериментальной точки.

АЛГОРИТМ ИССЛЕДОВАНИЙ НАНОМАТЕРИАЛОВ В ТЕСТАХ *IN VITRO*

Алгоритм исследований токсичности наноматериалов в тестах *in vitro* основан на научных данных, накопленных к настоящему времени, и применим к начальному этапу развития процесса оценки риска, обусловленного наноматериалами.

Производитель должен предоставить информацию о производимом количестве, области применения и физико-химических свойствах наноматериалов. Допускается указывать характеристики тестируемого материала со ссылкой на опубликованные научные данные.

П.1. Возможно ли воздействие наноматериала на население или работающих? Производится ли наноматериал в объеме, составляющем более 1 кг/год?

- Если нет, то: проводится исследование токсичности объемной (макродисперсной или сплошной) фазы, изучение биологического действия наночастиц может проводиться выборочно – переход к П.8.

- Если да (хотя бы в одном случае), то - переход к П.2.

П.2. Является ли материал водорастворимым?

- Если нет - переход к П.3.

- Если да - то: проводится исследование токсичности объемной (макродисперсной или сплошной) фазы, изучение биологического действия наночастиц может проводиться выборочно – переход к П.8.

П.3. Близка ли форма наночастицы к сферической?

- Если нет - переход к П.4.

- Если да - переход к П.5

П.4. Превосходит ли максимальная размерность (длина) частиц 5 микрон?

- Если нет - проводится исследование цитотоксичности наноматериала в сравнении с объемной (макродисперсной или сплошной) фазой, исследования по специфическому биологическому действию могут проводиться выборочно, в зависимости от области применения – переход к П.7.

- Если да - переход к П.6

П.5. Превосходит ли минимальная размерность (диаметр) частиц 50 нм?

- Если нет - изучают цитотоксичность на нормальных и трансформированных клетках (жизнеспособность клеток - МТТ), способность вызывать воспаление, окислительный стресс, апоптоз, влияние на клеточный цикл, систему цитохрома Р 450 - переход к П.6

- Если да - проводится исследование цитотоксичности наноматериала в сравнении с объемной (макродисперсной или сплошной) фазой, исследования по специфическому биологическому действию могут проводиться выборочно, в зависимости от области применения – переход к П.7.

П.6. Имеются ли данные о накоплении наноматериала в клетках?

- Если имеются данные об отсутствии эффекта - переход к П.7.

- Если данные отсутствуют, изучается возможность проникновения через биомембраны и барьеры организма, накопления в клетках.

П.7. Имеются ли сведения о взаимодействии с ДНК и/или белками, мембранами?

- Если нет - переход к П.8.

- Если да или сведения отсутствуют, проводятся исследования на мутагенность в микроядерном тесте (культура лимфоцитов человека), тесте Эймса с метаболической активацией и без нее (*S. typhimurium*); на эмбриотоксичность (*Lymnaea stagnalis*).

П.8. Имеются ли данные о возможности поступления наноматериала в окружающую среду?

- Если наночастицы не поступают в окружающую среду, исследования на гидробионтах/почвенных организмах не проводятся.

- Если имеются данные о возможности попадания наночастиц в окружающую среду (например, со сточными водами) – проводятся исследования на *Tetrahymena pyriformis* или *Daphnia magna*.